Nome operatore: Seffin Luca Data: XX marzo 2019

Esperienza 1: passaggio di cellule in coltura

Scopo: Diluizione di linee cellulari in coltura per il mantenimento delle stesse per periodi prolungati

Commento: In situazioni di totale o anche non totale confluenza, le cellule presentano pattern metabolici differenti. Confluenza è la condizione in cui le cellule sono cresciute sino ad occupare tutto lo spazio disponibile, con esaurimento dei nutrienti e inibizione della proliferazione con passaggio alla quiescenza.

Procedimento: Sono state considerate due linee cellulari: H1299 (epiteliali derivanti da carcinoma polmonare umano) e BJ (fibroblasti umani). Le cellule sono state fatte crescere all’interno di flask con plastica funzionale sul fondo che ne ha permesso l’adesione. I terreni utilizzati sono stati DMEM per le BJ e RPMI per le H1299. Stimato il grado di confluenza con l’oculare 4x. Per il passaggio sono state scelte le H1299 in quanto stimato un grado di confluenza maggiore. L’osservazione ha evidenziato una struttura cellulare più piccola e quadrata di queste cellule, con anche la presenza di “isolotti” cellulari, cosa non osservata con le BJ. Sotto cappa, una volta eliminato il terreno, lavare con PBS per eliminare residui contenenti inibitori della tripsina. Aggiungere EDTA + tripsina per indurre rottura legami cellula-cellula e cellula-plastica con conseguente distaccamento delle cellule. Mettere a incubare la flask a 37°C per una decina di minuti con il tappo semi-aperto.(Commento: ai fini della tripsinizzazione non è importante) Per controllare l’efficacia del distaccamento, sbattere leggermente e lateralmente la flask, quindi passare all’osservazione a microscopio: le cellule se distaccate cambiano conformazione risultando rotondeggianti e più rifrangenti, a diversi livelli focali in sospensione. Neutralizzare la tripsina aggiungendo terreno completo (con FBS che contiene gli inibitori della tripsina). Eseguire ulteriori 2 spipettamenti con rilascio del terreno in modo da andare a lavare tutta la superficie funzionale della flask. Trasferire la sospensione in una Falcon da 15mL, centrifugare a 1'000 RPM per 5 minuti. In questa maniera solamente le cellule vitali risultano precipitare. Rimuovere il surnatante, poi eseguire Movimentare la Falcon (con il tappo chiuso) con dei colpetti di modo da indurre un distaccamento più facile del pellet. Risospendere delicatamente con terreno fresco e spipettare fino alla dissoluzione completa del pellet. Contare le cellule presenti in 1mL della sospensione tramite la camera di Neubauer. Si contano le cellule presenti all’interno di ciascuno dei 4 quadrati più grandi separati dalla croce centrale. Sono state contate rispettivamente 22-25-20-15 cellule, con una media di 20.5 cellule/0.1µL. Per sapere quante cellule sono contenute in 1mL moltiplicare tale valore per 104. La concentrazione della coltura è risultata essere di 20.5\*104 cell/mL. Per ottenere la concentrazione finale richiesta di 5\*104 cell/mL in volume finale di 5mL, è stato ottenuto il fattore di diluizione Fd = Ci/Cf = 20.5\*104 /5\*104 = 4.1. Quindi il volume da prelevare dalla sospensione iniziale è risultato Vi = Vf/Fd = 5mL/4.1 = 1.2mL, ai quali sono poi stati aggiunti 3.8mL di terreno per portare a volume finale di 5mL. Il numero di cellule iniziale è risultato essere sufficiente per diluire alla concentrazione richiesta. Se l’incubatore, a causa di continue ri-aperture, non dovesse mantenere costante la temperatura di 37°C, potrebbe essere necessario più tempo per ottenere un efficace distaccamento delle cellule.

Commento:

1) Procedimento descritto in maniera molto chiara e con un buon flusso logico;

2) Meglio separare scopo da procedimento;

3) Mancava una descrizione più dettagliata degli ingrandimenti del microscopio usati, ovvero che l’ingrandimento totale è di 40X per l’osservazione della confluenza e 100-200X per l’osservazione di strutture particolari come il nucleo etc. (ovvero l’ingrandimento totale è dato dal 10X negli oculari, e 4X-10X e 20X degli obiettivi posti sul revolver).

4) E’ importante che il tappo della flask sia socchiuso quando le cellule rimangono nell’incubatore durante la crescita. Durante la tripsinizzazione, che dura solo alcuni minuti, ciò è irrilevante.